

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/17, C07K 14/62, A61K 38/28		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/64598
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Dezember 1999 (16.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03490		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Mai 1999 (21.05.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 25 447.4 6. Juni 1998 (06.06.98) DE			
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): HOECHST MARION ROUSSEL DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE).			
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht	
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): ERTL, Johann [DE/DE]; Ginsterweg 10, D-65817 Bremthal (DE). HABERMANN, Paul [DE/DE]; Rosserstrasse 35, D-65817 Eppstein (DE). GEISEN, Karl [DE/DE]; Jahnstrasse 43, D-60318 Frankfurt (DE). SEIPKE, Gerhard [DE/DE]; Wiesenstrasse 44, D-65719 Hofheim (DE). WOLLMER, Axel [DE/DE]; Hans Böckler Allee 31, D-52074 Aachen (DE).		<i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: NOVEL INSULIN ANALOGS WITH ENHANCED ZINC BINDING			
(54) Bezeichnung: NEUE INSULINANALOGA MIT ERHÖHTER ZINKBINDUNG			
(57) Abstract			
The invention relates to insulin analogs exhibiting enhanced zinc binding capacity and to stable zinc complexes thereof having a retarded activity in comparison with human insulin. The invention further relates to a method for the production of said insulin analogs and to their use, particularly in pharmaceutical preparations for therapy of type I and type II diabetes mellitus.			
(57) Zusammenfassung			
Die vorliegende Erfindung betrifft Insulinanaloga, welche ein erhöhtes Zinkbindungsvermögen aufweisen, sowie stabile Zinkkomplexe derselben, die im Vergleich zu Humaninsulin ein verzögertes Wirkprofil aufweisen, ein Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung insbesondere in pharmazeutischen Zubereitungen zur Therapie des Diabetes mellitus vom Typ I wie auch Typ II.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

Beschreibung**Neue Insulinanaloga mit erhöhter Zinkbindung**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Insulinanaloga, welche ein erhöhtes Zinkbindungsvermögen aufweisen, sowie stabile Zinkkomplexe derselben, die im Vergleich zu Humaninsulin ein verzögertes Wirkprofil aufweisen, ein Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung insbesondere in pharmazeutischen Zubereitungen zur Therapie des Diabetes mellitus vom Typ I wie auch Typ II.

10

Weltweit leiden etwa 120 Mio. Menschen an Diabetes mellitus. Darunter sind etwa 12 Mio. Typ I-Diabetiker, für die die Substitution der fehlenden endokrinen Insulinsekretion die einzige derzeit mögliche Therapie darstellt. Die Betroffenen sind lebenslang, in der Regel mehrmals täglich, auf Insulininjektionen angewiesen. Im

15 Gegensatz zum Typ I-Diabetes besteht beim Typ II-Diabetes nicht grundsätzlich ein Mangel an Insulin, jedoch wird in einer Vielzahl von Fällen, vor allem im fortgeschrittenem Stadium, die Behandlung mit Insulin, gegebenenfalls in Kombination mit einem oralen Antidiabetikum, als günstigste Therapieform angesehen.

20

Beim Gesunden ist die Insulinfreisetzung durch den Pankreas strikt an die Konzentration der Blutglucose gekoppelt. Erhöhte Blutglucosespiegel, wie sie nach Mahlzeiten auftreten, werden durch eine entsprechende Steigerung der Insulinsekretion rasch kompensiert. Im nüchternen Zustand sinkt der

25 Plasmainsulinspiegel auf einen basalen Wert ab, der ausreicht, eine kontinuierliche Versorgung insulinsensitiver Organe und Gewebe mit Glucose zu gewährleisten und die hepatische Glucoseproduktion in der Nacht niedrig zu halten. Der Ersatz der körpereigenen Insulinsekretion durch exogene, meist subcutane Applikation von Insulin erreicht in der Regel die oben beschriebene Qualität der physiologischen
30 Regulation der Blutglucose nicht annähernd. Häufig kommt es zu Entgleisungen der Blutglucose nach oben oder unten, die in ihren schwersten Formen lebensbedrohlich sein können. Daneben stellen jedoch auch über Jahre erhöhte Blutglucosespiegel ohne anfängliche Symptome ein erhebliches Gesundheitsrisiko dar. Die

- großangelegte DCCT-Studie in den USA (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) N. Engl. J. Med. **329**, 977-986) wies eindeutig nach, daß chronisch erhöhte Blutglucosespiegel wesentlich für die Entwicklung diabetischer Spätschäden verantwortlich sind. Diabetische Spätschäden sind mikro- und makrovaskuläre Schädigungen, die sich u. U. als Retino-, Nephro-, oder Neuropathie manifestieren und zu Erblindung, Nierenversagen sowie dem Verlust von Extremitäten führen und darüber hinaus mit einem erhöhten Risiko für Herz/Kreislauferkrankungen einhergehen. Daraus ist abzuleiten, daß eine verbesserte Therapie des Diabetes in erster Linie darauf abzielen muß, die
- 5 Blutglucose möglichst eng im physiologischen Bereich zu halten. Nach dem Konzept der intensivierten Insulintherapie soll dies durch mehrmals tägliche Injektionen von schnell und langsam wirkenden Insulinzubereitungen erreicht werden. Rasch wirkende Formulierungen werden zu den Mahlzeiten gegeben, um den postprandialen Anstieg der Blutglucose auszugleichen. Langsam wirkende
- 10 Basalinsuline sollen die Grundversorgung mit Insulin insbesondere während der Nacht sicherstellen, ohne zu einer Hypoglykämie zu führen.
- 15

Die derzeit verfügbaren Basalinsuline erfüllen diese Anforderung nur unzureichend. Speziell die häufig verwendeten NPH-Insuline weisen ein zu stark ausgeprägtes Wirkungsmaximum auf und haben eine zu kurze Gesamtwirkung. Dies birgt bei abendlicher Applikation die Gefahr einer nächtlichen Hypoglykämie und einer morgendlichen Hyperglykämie.

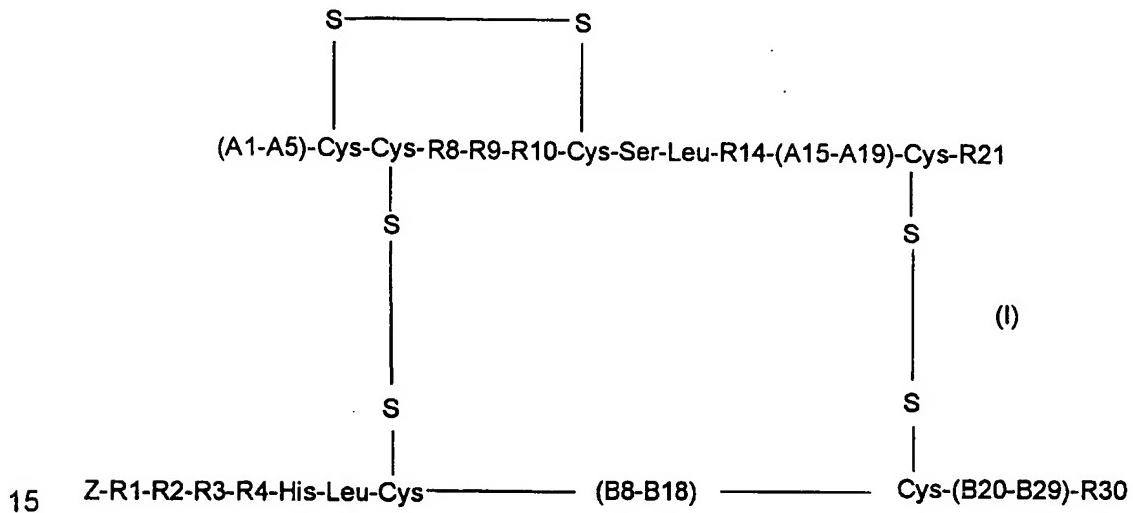
- 20 Aus der EP 0 821 006 sind Insulinanaloge mit erhöhtem Zinkbindungsvermögen bekannt, die in Verbindung mit Zink ein gegenüber Humaninsulin verzögertes Wirkprofil aufweisen. Diese Analoga unterscheiden sich von Humaninsulin im wesentlichen durch Variation der Aminosäure in Position A21 der A-Kette und durch Addition eines Histidinrestes oder eines Peptides mit 2 bis 35 Aminosäureresten, welches 1 bis 5 Histidinreste enthält, an Position B30 der B-Kette.
- 25
- 30 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, weitere Insulinanaloge (Analoga von humanem oder tierischem Insulin) bereitzustellen, die ein erhöhtes Zinkbindungsvermögen aufweisen, einen stabilen Komplex, enthaltend ein Hexamer

des Insulinanalogs und Zink, bilden und in geeigneter Zubereitung bei subcutaner Injektion infolge des im Vergleich zu Humaninsulin verzögerten Wirkprofils eine verbesserte Therapie des Diabetes mellitus vom Typ I wie auch Typ II ermöglichen.

- 5 Insulinanaloge leiten sich von natürlich vorkommenden Insulinen, nämlich Humaninsulin (s. SEQ ID NO: 1: A-Kette von Humaninsulin und SEQ ID NO: 2: B-Kette von Humaninsulin) oder tierischen Insulinen, durch Substitution oder Fehlen wenigstens eines natürlich auftretenden Aminosäurerestes und/oder Addition wenigstens eines Aminosäurerestes an A- und/oder B-Kette des natürlich vorkommenden Insulins ab.
- 10

Die Aufgabe wird gelöst durch

1. ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I



worin bedeuten

- (A1-A5) die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO: 1) oder tierischem Insulin,
- 20 (A15-A19) die Aminosäurereste in den Positionen A15 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO: 1) oder tierischem Insulin,
- (B8-B18) die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO: 2) oder tierischem Insulin,

(B20-B29) die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B29 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO: 2) oder tierischem Insulin,

R8 Thr oder Ala,

R9 Ser oder Gly,

5 R10 Ile oder Val,

R14 Tyr, His, Asp oder Glu,

R21 Asn, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala, Glu oder Gln,

R1 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest, abwesend oder ein Wasserstoffatom,

10 R2 Val, Ala oder Gly,

R3 Asn, His, Glu oder Asp,

R4 Ala, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Gly oder Glu,

R30 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder -OH,

Z ein Wasserstoffatom oder ein Peptidrest mit 1 bis 4 genetisch

15 kodierbaren Aminosäureresten, enthaltend 1 bis 4 Histidinreste (His),

mit der Maßgabe, daß für den Fall, daß Z ein Wasserstoffatom bedeutet, R1 oder R3 His, Glu oder Asp bedeuten, wobei R3 His bedeutet, wenn R1 einen neutralen oder negativ geladenen Aminosäurerest darstellt, oder mit der Maßgabe, daß für den Fall, daß Z ein Wasserstoffatom bedeutet, R14 His, Asp oder Glu bedeutet, und ferner mit der Maßgabe, daß sich das Insulinanalogon oder das physiologisch verträgliche Salz desselben der Formel I nicht allein durch Variation der Aminosäurereste in den Positionen R3 oder R3 in Verbindung mit R21 oder R3 in Verbindung mit R4 in Formel I von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2) unterscheidet.

25 Vorzugsweise ist das Insulinanalogon oder das physiologisch verträgliche Salz desselben dadurch gekennzeichnet, daß

2. R8 Thr, R9 Ser und R10 Ile bedeuten,

30 3. R1 Phe, His, Asn, Asp oder Gly bedeutet,

4. R30 Thr, Ala oder Ser bedeutet oder

5. dadurch gekennzeichnet, daß R21 Asn und R1 Phe bedeuten.
6. Eine bevorzugte Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung ist ein Insulinanalogen oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I,
- 5 welches dadurch gekennzeichnet ist, daß R2 Val, R3 Asn und R4 Gln bedeuten.

Ferner bevorzugt ist ein Insulinanalogen oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß R14

- 10 7. Tyr,
 8. His,
 9. Asp oder
- 15 10. Glu bedeutet.

Ferner bevorzugt ist ein Insulinanalogen oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, welches sich dadurch auszeichnet, daß R30

- 20
11. Thr,
 12. Ala,
- 25 13. Ser oder
14. -OH

bedeutet.

- 30 Besonders bevorzugt ist ein Insulinanalogen oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß Z

15. His,
16. His-Ala- oder

5 17. His-Ala-Ala-

bedeutet.

Beispiele für Insulinanaloge gemäß der vorliegenden Erfindung sind

- 10 18. ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz
His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
15 Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
aufweist (SEQ ID NO: 3), beispielsweise das His(B0), des (B30)-Humaninsulin,
20 19. ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz
His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
25 aufweist (SEQ ID NO: 4), beispielsweise das His(B0)-Humaninsulin,
20. ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz
30 His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

aufweist (SEQ ID NO: 5), beispielsweise das His (B-1), Ala (B0)-Humaninsulin oder

21. ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der
5 Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

- 10 aufweist (SEQ ID NO: 6), beispielsweise das His(B-2), Ala(B-1), Ala(B0)-Humaninsulin.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung des
Insulinanalogs oder eines physiologisch verträglichen Salzes desselben gemäß
15 der vorliegenden Erfindung, umfassend die Konstruktion eines replizierbaren
Expressionsvehikels, welches eine DNA-Sequenz enthält, die für einen Vorläufer
des Insulinanalogs mit der allgemeinen Aminosäuresequenz II kodiert

Met-X²_m-(Arg)_p-Z-R1-R2-R3-R4-His-Leu-Cys-(B8-B18)-Cys-(B20-B29)-R30-X¹_n-Arg-
20 (A1-A5)-Cys-Cys-R8-R9-R10-Cys-Ser-Leu-R14-(A15-A19)-Cys-R21

II,

worin

X¹_n eine Peptidkette mit n Aminosäureresten ist, wobei n eine ganze
Zahl von 0 bis 34 bedeutet,

25 X²_m eine Peptidkette mit m Aminosäureresten ist, wobei m eine ganze
Zahl von 0 bis 20 bedeutet,

p 0, 1 oder 2,

R30 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest bedeutet
oder abwesend ist und

30 Z abwesend ist oder ein Peptidrest mit 1 bis 4 genetisch
kodierbaren Aminosäureresten, enthaltend 1 bis 4 Histidinreste
(His) bedeutet

und die übrigen Variablen die vorstehend unter Nr. 1 genannten Bedeutungen haben, wobei auch die vorstehend genannten Maßgaben gelten, Expression in einer Wirtszelle und Freisetzung des Insulinanalogs aus dessen Vorläufer mit chemischen und/oder enzymatischen Methoden.

5

Vorzugsweise ist die Wirtszelle ein Bakterium, besonders bevorzugt Bakterium E. coli.

10 Vorzugsweise ist die Wirtszelle eine Hefe, besonders bevorzugt *Saccharomyces cerevisiae*.

Bei der Expression in *E. coli* bilden die genannten Fusionsproteine (SEQ ID NO: 7 bis 9) in der Regel unlösliche Einschlußkörperchen (inclusion bodies), die nach Zellaufschluß durch Zentrifugation isoliert werden können und unter Verwendung 15 chaotoper Zusätze (z. B. 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidiniumchlorid) wieder gelöst werden. Das gelöste Fusionsprotein kann einer Sulfitolyse unterzogen werden, bei der SH-Reste in S-Sulfonate überführt werden (z. B. R.C. Marshall und A.S. Iglis in „Practical Protein Chemistry – A Handbook“, Herausgeber A. Darbre (1986), Seiten 49-53). Dadurch verbessert sich die Löslichkeit des Fusionsproteins und erleichtert 20 die Reinigung beispielsweise mittels Anionenaustauscher- oder Gelpermeationschromatographie.

Die Überführung des derivatisierten Fusionsproteins in Präproinsulin mit nativer räumlicher Struktur und korrekt ausgebildeten Disulfidbrücken (Faltung) erfolgt in verdünnter wäßriger Lösung durch Zusatz einer begrenzten Menge eines SH- 25 Reagens wie Merkaptethanol, Cystein oder Glutathion und anschließender Luftoxidation. Alternativ kann das gelöste, nicht derivatierte Fusionsprotein unter ähnlichen Bedingungen auch direkt gefaltet werden (EP-A-0 600 372; EP-A-0 668 292).

Präproinsulin wird anschließend durch limitierte proteolytische Spaltung in biologisch 30 aktives Insulin überführt. Hierfür kann Trypsin verwendet werden, welches die in Formel II mit $\text{Met-X}_m^2-(\text{Arg})_p$ bezeichneten Präsequenz entfernt und an der mit X_n^1-Arg bezeichneten Peptidkette spaltet und damit B- und A-Kette trennt. In der Regel beginnt die Sequenz X^1 mit Arg, Arg_2 oder sie ist nicht vorhanden ($n=0$), so daß nach

der Spaltung ein Insulinderivat vorliegt, das mit Arg oder Arg₂ am C-Terminus der B-Kette verlängert ist. Diese Aminosäuren können mit Carboxypeptidase B entfernt werden. Die tryptische Spaltung kann durch Erhöhung der Trypsinkonzentration oder Verlängerung der Reaktionsdauer auch so geführt werden, daß zusätzlich an

- 5 Lysin(B29) gespalten wird. In diesem Fall entsteht ein des(B30)-Insulinderivat. Das bei der Spaltung entstandene Insulinanalogon kann durch chromatographische Standardverfahren (z. B. Ionenaustauscher- und Reversed-Phase-Chromatographie) gereinigt und zuletzt durch Fällung, Kristallisation oder einfache Gefriertrocknung isoliert werden.

10

Der Vorläufer des Insulinanalogons hat vorzugsweise die Sequenz

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg

- 15 His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala
Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys

20 Asn

(SEQ ID NO: 7), beispielsweise die Sequenz des His (B0)-Präproinsulins, oder die Sequenz

- 25 Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala
Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
30 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
Asn

(SEQ ID NO: 8), beispielsweise die Sequenz des His(B-1), Ala(B0)-Präproinsulins, oder die Sequenz

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg

- 5 His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala
Gly Ser Leu Gln Pro Leu A'a Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys
- 10 Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

(SEQ ID NO: 9), beispielsweise die Sequenz des His(B-2), Ala(B-1), Ala(B0)-Präproinsulins.

- 15 Die vorliegende Erfindung betrifft auch die vorstehend genannten Vorläufer der Insulinanaloge gemäß der vorliegenden Erfindung, insbesondere die Präproinsuline, die DNA-Sequenzen, welche für einen Vorläufer des Insulinanalogons gemäß der vorliegenden Erfindung kodieren, die Expressionsvehikel, welche eine DNA-Sequenz enthalten, die für einen erfindungsgemäßen Vorläufer des
- 20 Insulinanalogons gemäß der vorliegenden Erfindung kodiert, sowie eine Wirtszelle, die mit einem solchen Expressionsvehikel transformiert ist.

- Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein Insulinanalogon und/oder mindestens ein physiologisch verträgliches Salz gemäß der vorliegenden Erfindung.

Vorzugsweise zeichnet sich die pharmazeutische Zubereitung dadurch aus, daß sie das erfindungsgemäße Insulinanalogon und/oder das physiologisch verträgliche Salz desselben in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form enthält.

30

Die pharmazeutische Zubereitung enthält wahlweise ferner einen Depothilfsstoff, vorzugsweise Protaminsulfat, wobei das Insulinanalogon und/oder das physiologisch

verträgliche Salz desselben vorzugsweise mit dem Protaminsulfat in einem Cokristallisat vorliegt.

Die pharmazeutische Zubereitung gemäß der vorliegenden Erfindung kann

- 5 wahlweise zusätzlich unmodifiziertes Humaninsulin und/oder ein weiteres Insulinanalogon enthalten, vorzugsweise Gly(A21)-Arg(B31)-Arg(B32)-Humaninsulin.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine injizierbare Lösung mit Insulinaktivität, welche die pharmazeutische Zubereitung gemäß der vorliegenden Erfindung in

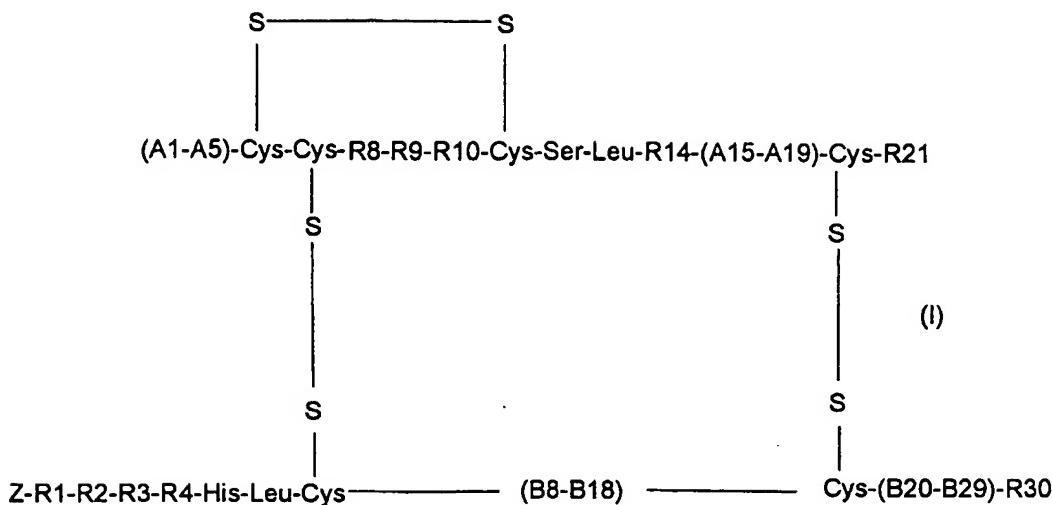
- 10 gelöster Form enthält, vorzugsweise gekennzeichnet durch einen Gehalt von 1 µg bis 2 mg Zink pro ml, besonders bevorzugt durch einen Gehalt von 5 µg bis 200 µg Zink pro ml.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung des Insulinanalogons

- 15 und/oder dessen physiologisch verträglichen Salzes gemäß der vorliegenden Erfindung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welche eine Insulinaktivität mit verzögertem Wirkungseintritt aufweist.

Die eingangs gestellte Aufgabe wird ferner gelöst durch einen Insulin-Zink-Komplex,

- 20 enthaltend ein Insulinhexamer und 4 bis 10 Zinkionen pro Insulinhexamer, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulinhexamer aus sechs Molekülen eines Insulinanalogons der Formel I besteht,



worin bedeuten

- (A1-A5) die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- (A15-A19) die Aminosäurereste in den Positionen A15 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- (B8-B18) die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- (B20-B29) die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B29 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- R8 Thr oder Ala,
- R9 Ser oder Gly,
- R10 Ile oder Val,
- R14 Tyr, His, Asp oder Glu,
- R21 Asn, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala, Glu oder Gln,
- R1 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest, abwesend oder ein Wasserstoffatom,
- R2 Val, Ala oder Gly,
- R3 Asn, His, Glu oder Asp,
- R4 Ala, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Gly oder Glu,
- R30 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder -OH,
- Z ein Wasserstoffatom oder ein Peptidrest mit 1 bis 4 genetisch

kodierbaren Aminosäureresten, enthaltend 1 bis 4 Histidinreste (His).

Vorzugsweise enthält der Insulin-Zink-Komplex 5 bis 8 Zinkionen pro Insulinhexamer.

5

Vorzugsweise enthält der Insulin-Zink-Komplex ein Insulinhexamer, das aus sechs Molekülen des vorstehend beschriebenen Insulinanalogons der Formel I gemäß der vorliegenden Erfindung besteht.

- 10 Der Insulin-Zink-Komplex gemäß der vorliegenden Erfindung ist vorzugsweise auch dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette des Insulinanalogons der Formel I die Sequenz

Phe Val His Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly

- 15 Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 10) aufweist, beispielsweise das His(B3)-Humaninsulin, oder dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette des Insulinanalogons der Formel I die Sequenz

- 20 Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 11) aufweist, beispielsweise das Asp(B3)-Humaninsulin.

- 25 Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens einen erfindungsgemäßen Insulin-Zink-Komplex sowie eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine saure Lösung mindestens eines Insulinanalogons und/oder eines physiologisch verträglichen Salzes desselben mit einer entsprechenden Menge an Zinkionen, welche die Ausbildung eines Insulin-
30 Zink-Komplexes gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht, wobei das Insulinanalogon und/oder das physiologisch verträgliche Salz vorzugsweise das vorstehend beschriebene Insulinanalogon der Formel I gemäß der vorliegenden

Erfindung oder ein Insulinanalogon der Formel I, dessen B-Kette die Sequenz mit der Nummer SEQ ID NO's.: 3, 4, 5, 10 oder 11 aufweist.

Die pharmazeutische Zubereitung ist vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß

- 5 sie den Insulin-Zink-Komplex in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form enthält.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine injizierbare Lösung mit Insulinaktivität, enthaltend die pharmazeutische Zubereitung in gelöster Form und ist vorzugsweise

- 10 gekennzeichnet durch einen Gehalt von 1 µg bis 2 mg Zink pro ml, besonders bevorzugt durch einen Gehalt von 5 µg bis 200 µg Zink pro ml.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung des Insulin-Zink-Komplexes zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welche eine Insulinaktivität mit

- 15 verzögertem Wirkungseintritt aufweist.

Die Insulinanaloge gemäß der vorliegenden Erfindung sind biologisch aktiv und

zeigen nach subcutaner Applikation als schwach saure, klare Lösung mit 80 µg Zn⁺⁺/ml (Zink/ml) am Hund eine stark verzögerte Wirkung. Bei dem Insulinanalogon,

- 20 welches am N-Terminus der B-Kette mit Histidin verlängert ist, das His(B0), des (B30)-Humaninsulin (s. SEQ ID NO.: 3), hängt das Wirkprofil beispielsweise sehr stark von der Menge an zugesetzten Zinkionen ab. Eine zinkfreie Zubereitung besitzt keinerlei Depoteffekt (Gesamtwirkung 6 - 8 h, Beispiel 8) und unterscheidet sich in der Pharmakodynamik kaum von Humaninsulin, während man nach Zusatz von

- 25 Zinkionen (80 µg/ml) eine starke Wirkungsverzögerung findet (Gesamtwirkung etwa 16 h, Beispiel 8). Der beobachtete Depoteffekt, ist also wesentlich ausgeprägter als der von NPH-Insulin. Darüber hinaus besitzt dieses Analogon den Vorteil, daß die

Pharmakodynamik durch Vorgabe des Zinkgehaltes in einer Breite steuerbar ist, wie es mit Humaninsulin nicht möglich ist. Formulierungen mit raschem Wirkungseintritt

- 30 lassen sich ebenso wie solche mit mäßig oder stark verzögter Wirkung mit einer Wirksubstanz allein durch die Variation des Zinkgehaltes herstellen. Damit kann das Wirkprofil individuell den Bedürfnissen des Patienten angepaßt werden, entweder unter Verwendung einer Zubereitung mit entsprechend voreingestelltem Zinkgehalt

oder durch Mischung von Zubereitungen mit hohem und niedrigem Zinkgehalt durch den Arzt oder den Patienten selbst.

Die hier beschriebenen Analoga sind ferner dadurch charakterisiert, daß sie im

- 5 Vergleich zu Humaninsulin eine erhöhte Affinität zu Zinkionen aufweisen.

Humaninsulin bildet in wäßriger neutraler Lösung Hexamere, welche jeweils zwei Zinkionen über die His(B10)-Seitenketten komplexieren. Diese Zinkionen lassen sich durch Dialyse gegen wäßrige Puffer im Neutralen nicht entfernen. Unter den

- 10 gleichen Bedingungen binden die hier beschriebenen Analoga mehr als 4 Zinkionen.

Im Falle des erfindungsgemäßen His(B0)-Des(B30)- und His(B3)-Insulin sind dies etwa 7 Zinkionen/Hexamer, bei Asp(B3)-Insulin wurden 4,2 Zinkionen/Hexamer gemessen (Beispiel 9).

- 15 Es ist bekannt, daß in neutralen Lösungen Zink zur Bildung höhermolekularer Assoziate und zur Ausfällung des Insulins führt. Nach der Injektion einer schwach sauren zinkhaltigen Zubereitung, die Insulin klar gelöst enthält, kommt es daher im subcutanen Gewebe durch Neutralisation zur Bildung von Insulin-Zinkkomplexen und in der Folge zur Präzipitation des Insulins. Aus diesem Depot geht Insulin wieder

- 20 in Lösung und gelangt dann verzögert in den Blutstrom und an den Wirkort. Diese Wirkungsverzögerung ist bei Humaninsulin nur schwach, bei den hier beschriebenen Analoga aufgrund der erhöhten Affinität zu Zink jedoch stark ausgebildet. Die erhöhte Zinkbindung stellt daher die Grundlage für die oben beschriebenen zinkabhängige Wirkungsverlängerung dar.

- 25 Die vorliegende Erfindung betrifft daher nicht nur die beschriebenen Insulinanaloga sondern auch auf die zugehörigen Insulin-Zink-Komplexe. Diese Komplexe unterscheiden sich von den entsprechenden Humaninsulin-Zink-Komplexen dadurch, daß sie einen höheren Anteil an fest gebundenem Zink aufweisen. Es ist daher naheliegend, daß neben Zink auch andere Übergangsmetallionen wie zum

- 30 Beispiel Cobalt oder Kupfer zur Bildung entsprechender Komplexe eingesetzt werden können.

Beispiel 1: Konstruktion des Plasmides pINT345d kodierend für die Variante His(B3)-Präproinsulin.

Das US Patent mit der Patentnummer 5358857 beschreibt das Plasmid pINT90d.

- 5 DNA dieses Plasmides dient als Ausgangsmaterial zur Konstruktion des Plasmides pINT345d, welches gegenüber pINT90d durch zwei neue Eigenschaften charakterisiert ist. Es kodiert zum einen für ein Präproinsulinanalogon, das in Position 3 der B-Kette die Aminosäure Histidin statt Asparagin enthält und trägt zum anderen unmittelbar vor Beginn der für diese Präproinsulinvariante kodierenden
- 10 Sequenz eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BssH2, so daß die für die N-terminalen 10 Aminosäuren des Präproinsulinanalogons kodierende Sequenz leicht manipulierbar wird, wenn man die Dra3-Spaltstelle im Verlauf der Präproinsulinsequenz berücksichtigt.

Zur Konstruktion des Plasmides pINT345d wird DNA des Plasmides pINT90d in

- 15 einem Doppelverdauansatz in Position 284bp durch das Restriktionsenzym NcoI und in Position 351 bp durch das Restriktionsenzym Dra3 gespalten, so daß zwei Fragmente entstehen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Spaltgemisches wird das große Restplasmid-DNA-Fragment isoliert.

Dieses DNA-Fragment wird dann mit dem synthetischen DNA-Fragment der Form

↳ Ncol	BssH2	B1	B2	His	B4	B5	B6
5'- C ATG GCA ACA ACA TCA ACA GGA AAT TCG GCG CGC TTT GTG CAC CAG CAC CTG							
3'- CGT TGT TGT AGT TGT CCT TTA AGC CGC GCG AAA CAC GTG GTC GTG GAC							

5 B7 B8 B9 $\frac{1}{2}$ Dra3
 TGC GGC TCC CAC CTA - 3
 ACG CCG AGG GTG - 5

in einer T4-DNA-Ligasereaktion umgesetzt. Kompetente E.coli K12-Zellen werden mit dem Ligationsgemisch transformiert und der Transformationsansatz auf NA-Platten, die 20mg/l Ampicillin enthalten, ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37° C inkubiert. Von entstandenen Kolonien wird Plasmid-DNA isoliert mit dem Restriktionsenzym BssH2 gespalten. Die gewünschte Plasmid-DNA wird dabei linearisiert und unterscheidet sich so von pINT90d-DNA, die keine BssH2-Schnittstelle enthält und entsprechend nicht gespalten wird.

Die Plasmid-DNA eines Klones, die sich richtig verhält, wird mit pINT345d bezeichnet.

Sie dient als Ausgangsmaterial für die Konstruktion der im folgenden beschriebenen Präproinsulinvarianten.

Beispiel 2: Konstruktion des Plasmides pINT342d kodierend für die Variante His(B0)-Präproinsulin

25 DNA des Plasmides pINT345d wird mit den Enzymen BssH2 und Dra3 doppelverdaut und das große Restplasmidfragment nach gelektrophoretischer Trennung isoliert. Dieses DNA-Fragment wird mit dem synthetischen DNA-Fragment der Form

30	His B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10
	5'- CG CGC CAC TTT GTT AAC CAG CAC CTG TGC GGC TCC CAC CTA - 3'
	3'- G GTG AAA CAA TTG GTC GTG GAC ACG CCG AGG GTG - 5'
	$\frac{1}{2}$ BssH2 HpaI $\frac{1}{2}$ Dra3

in einer T4-DNA-Ligaseraktion umgesetzt. Es entsteht das Plasmid pINT342d, das durch eine zusätzliche Hpa1-Schnittstelle gegenüber dem Ausgangsplasmid

charakterisiert ist. Das Plasmid kodiert für eine Präproinsulinvariante die in Position B0 ein Histidin aufweist.

Beispiel 3: Konstruktion des Plasmides pINT343d kodierend für die Variante

- 5 His(B-1), Ala(B0)-Präproinsulin

DNA des in Beispiel b beschriebenen Restplasmidfragmentes wird mit einem synthetischen DNA-Fragment der Form

10 His Ala B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11
 5' - CG CGC CAC GCT TTT GTT AAC CAG CAC CTG TGC GGC TCC CAC CTA - 3'
 3' - G GTG CGA AAA CAA TTG GTC GTG GAC ACG CCG AGG GTG - 5'
 $\frac{1}{2}$ BssH2 Hpa1 $\frac{1}{2}$ Dra3

- 15 in einer T4-DNA-Ligasereaktion umgesetzt. Es entsteht das Plasmid pINT343d, das wie auch pINT342d gegenüber dem Ausgangsvektor eine zusätzliche Hpa1-Schnittstelle enthält.

Beispiel 4: Konstruktion des Plasmides pINT344d kodierend für die Variante

- 20 His(B-2), Ala(B-1), Ala(B0)-Präproinsulin

DNA des in Beispiel b beschriebenen Restplasmidfragmentes wird mit einem synthetischen DNA-Fragment der Form

25 His Ala Ala B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11
 5' - CG CGC CAC GCT GCT TTT GTT AAC CAG CAC CTG TGC GGC TCC CAC CTA - 3'
 3' - G GTG CGA CGA AAA CAA TTG GTC GTG GAC ACG CCG AGG GTG - 5'
 $\frac{1}{2}$ BssH2 Hpa1 $\frac{1}{2}$ Dra3

- 30 in einer T4-DNA-Ligasereaktion umgesetzt. Es entsteht das Plasmid pINT344d, das gegenüber dem Ausgangsvektor durch eine zusätzliche Hpa1-Schnittstelle charakterisiert ist.

Beispiel 5: Expression der konstruierten Insulinvarianten

Die Plasmide pINT 342d, 343d und 344d werden beispielhaft jeweils nach E.coli K12 W3110 transformiert. Rekombinante Bakterien, welche die Plasmide für die jeweilige

- 5 Variante enthalten, werden dann gemäß Beispiel 4 des US Patentes mit der Patentnummer 5227293 fermentiert und so der gewünschte Rohstoff zur Erzeugung der jeweiligen Insulinvariante erzeugt.

Beispiel 6: Herstellung von His(B0),Des(B30)-Insulin

10

Gemäß Beispiel 5 wird die Präproinsulinvariante in E.coli exprimiert und in Form von Einschlußkörperchen (inclusion bodies) nach Zellaufschluß durch Zentrifugation isoliert. Die Einschlußkörperchen werden in Harnstoff (8 mol/l) gelöst, einer Sulfitolyse unterzogen und durch Anionenaustauscher (Q-Sepharose) und

- 15 Gelpermeationschromatographie (Sephacryl S 200) gereinigt. Die bei der Chromatographie eingesetzten Puffer enthalten 4 M Harnstoff und 50 mM Tris/HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan/HCl) pH 8,5. Die fraktionierte Elution am Anionenaustauscher erfolgt durch Anlegen eines Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl. Die Konzentration des Harnstoffs wird anschließend durch Ultrafiltration und
- 20 Verdünnen auf < 1 M reduziert und das Präproinsulin-S-Sulfonat durch Fällung bei pH 4 isoliert und zuletzt getrocknet.

Zur Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken, wie sie in natürlichem Proinsulin vorliegen, wird das Präproinsulin-S-Sulfonat bei einer Konzentration von 0,3 g/l in einem Puffer, der 20 mM Glycin enthält, bei pH 10,8 gelöst, mit Merkaptoethanol

- 25 versetzt (etwa 25-50 mol/mol Präproinsulin) und über Nacht bei 4 °C gerührt. Der Ansatz wird anschließend mit Phosphorsäure auf pH 3,5 gestellt und zentrifugiert. Das im Überstand enthaltene Präproinsulin wird zur Überführung in Insulin nach Zugabe von Tris (25 mM) auf pH 8,2 gestellt und mit Trypsin (1,5 mg/g Präproinsulin) versetzt. Der Verlauf der proteolytischen Spaltung wird mittels

- 30 Reversed Phase HPLC verfolgt. Nach etwa 6 Stunden enthält der Ansatz einen hohen Anteil an His(B0),D₁₈(B30)-Insulin. Die Reaktion wird durch Ansäuern auf pH 3,5 beendet. Die Reinigung des Insulinanalogs erfolgt durch Ionenaustauscher-Chromatographie (S-Hyper-D, Sepracor) und Reversed Phase Chromatographie

(PLRP-S RP300, Polymer Laboratories). Die Ionenaustauscherchromatographie wird in einem Puffer durchgeführt, der 30 % 2-Propanol und 50 mM Milchsäure (pH 3,5) enthält. Die Elution des gebundenen Insulins erfolgt durch einen linearen Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl. Die Reversed Phase Chromatographie erfolgt in 0,1 %

- 5 Trifluoressigsäure, der zur Elution steigende Mengen an Acetonitril zugemischt werden. Das Produkt wird durch Ausfällung bei pH 5,4 isoliert und lyophilisiert.

Beispiel 7: Formulierung von Insulinanaloga zur parenteralen Applikation

Die Zubereitungen enthalten je ml 40 bzw. 100 IE Insulin (1 IE entspricht etwa 6,2

- 10 nmol), 20 mg 85 % Glycerin, 2,7 mg m-Kresol und gegebenenfalls Zink⁺⁺ (als Zinkchlorid) in wässriger, steriler Lösung bei pH 4.

Beispiel 8: Wirkprofil von His(B0),Des(B30)-Insulin am Hund

- 15 Jeweils 6 Hunde (Beagles) erhielten subcutane Applikationen einer Zubereitung mit 40 U/ml (Beispiel 7) und dem angegebenen Gehalt an Zink. Die Dosis betrug 0,3 IE/kg. Im weiteren Verlauf des Versuchs wurde nach den angegebenen Zeiten die Konzentration der Blutglucose gemessen. Die Werte wurden prozentual auf den jeweiligen Ausgangswert normiert und gemittelt.

20

Zeit (Stunden)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
Zinkfrei	100	59	50	61	75	84	89	98	103	97	104	100
80 µg	100	97	83	75	65	56	51	58	68	72	78	82
Zink ⁺⁺ /ml												

Beispiel 9: Zinkbindung von Insulinanaloga

25

Eine Zubereitung von Insulin (0,3 mM Insulin, 0,13 M NaCl, 0,1 % Phenol, 100 µg/ml Zink⁺⁺ (als Zinkchlorid), 25 mM Tris/HCl, pH 7,4) wurde extensiv gegen zinkfreien

neutralen Puffer dialysiert (3h gegen 0,15 M NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,4 bei Raumtemperatur, 72 Stunden gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,4 bei 15 °C und nochmals 16 h gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,4 bei 15 °C). Danach wurden die Dialysate angesäuert und analysiert. Die Konzentration von Insulin wurde durch Reversed

- 5 Phase-HPLC und die des Zink durch Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Die Zinkwerte wurden mit dem Zinkgehalt eines Kontrollansatzes, der kein Insulin enthielt, korrigiert.

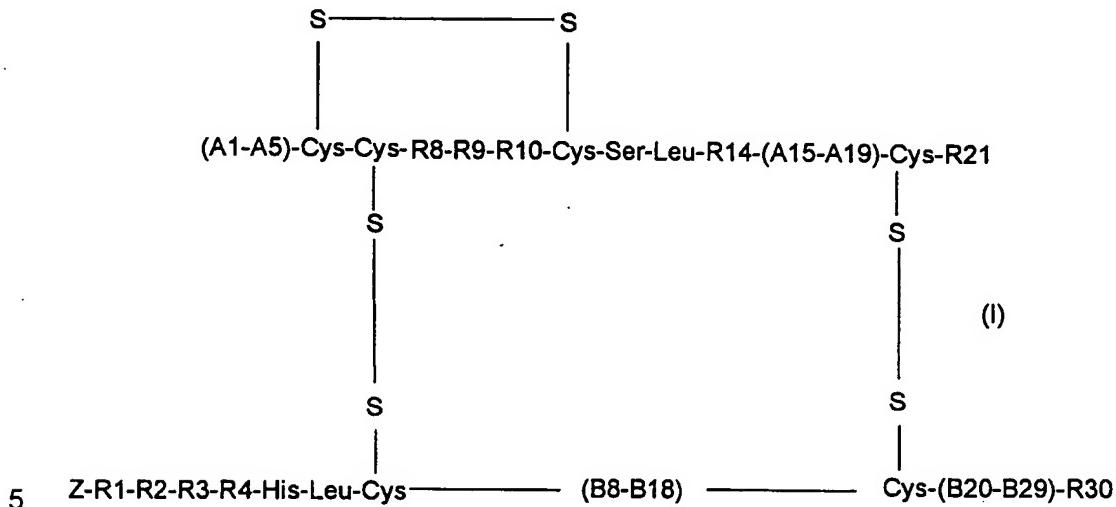
10

Zinkbindung

<i>Insulin</i>	<i>mol Zink/mol Hexamer</i>
Humaninsulin	2,5
His(B3)-Insulin	6,9
Asp(B3)-Insulin	4,2
His(B0),Des(B30)-Insulin	6,8

Patentansprüche

1. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel |



worin bedeuten

- (A1-A5) die Aminosäurerreste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,

10 (A15-A19) die Aminosäurerreste in den Positionen A15 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,

(B8-B18) die Aminosäurerreste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,

(B20-B29) die Aminosäurerreste in den Positionen B20 bis B29 der B-Kette von

15 Humaninsulin oder tierischem Insulin,

R8 Thr oder Ala,

R9 Ser oder Gly,

R10 Ile oder Val,

R14 Tyr, His, Asp oder Glu,

20 R21 Asn, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala, Glu oder Gln,

R1 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest, abwesend oder ein Wasserstoffatom,

R2 Val, Ala oder Gly,

- R3 Asn, His, Glu oder Asp,
- R4 Ala, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Gly oder Glu,
- R30 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder -OH,
- Z ein Wasserstoffatom oder ein Peptidrest mit 1 bis 4 genetisch
5 kodierbaren Aminosäureresten, enthaltend 1 bis 4 Histidinreste (His),
mit der Maßgabe, daß für den Fall, daß Z ein Wasserstoffatom bedeutet, R1 oder R3
His, Glu oder Asp bedeuten, wobei R3 His bedeutet, wenn R1 einen neutralen oder
negativ geladenen Aminosäurerest darstellt, oder mit der Maßgabe, daß für den Fall,
daß Z ein Wasserstoffatom bedeutet, R14 His, Asp oder Glu bedeutet, und ferner mit
10 der Maßgabe, daß sich das Insulinanalogon oder das physiologisch verträgliche Salz
dieselben der Formel I nicht allein durch Variation der Aminosäurereste in den
Positionen R3 oder R3 in Verbindung mit R21 oder R3 in Verbindung mit R4 in
Formel I von Humaninsulin unterscheidet.
- 15 2. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach
Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R8 Thr, R9 Ser und R10 Ile bedeuten.
3. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach
Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß R1 Phe, His, Asn, Asp oder Gly
20 bedeutet.
4. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach
einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß R30 Thr,
Ala oder Ser bedeutet.
- 25 5. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach
einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß
R21 Asn und R1 Phe bedeuten.
- 30 6. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach
einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß R2 Val,
R3 Asn und R4 Gln bedeuten.

7. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß R14 Tyr bedeutet.
- 5 8. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß R14 His bedeutet.
9. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach 10 einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß R14 Asp bedeutet.
10. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß R14 Glu 15 bedeutet.
11. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß R30 Thr bedeutet.
- 20 12. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß R30 Ala bedeutet.
- 25 13. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß R30 Ser bedeutet.
14. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach 30 einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß R30 -OH bedeutet.

15. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß Z His bedeutet.
- 5 16. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß Z His-Ala- bedeutet.
- 10 17. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß Z His-Ala-Ala- bedeutet.
- 15 18. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette die Sequenz
His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
aufweist (SEQ ID NO: 3).
- 20 19. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette die Sequenz
His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
aufweist (SEQ ID NO: 4).
- 25 20. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette die Sequenz
His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

aufweist (SEQ ID NO: 5).

21. Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach
5 Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

- 10 aufweist (SEQ ID NO: 6).

22. Verfahren zur Herstellung eines Insulinanalogons oder eines physiologisch
verträglichen Salzes desselben gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis
21, umfassend die Konstruktion eines replizierbaren Expressionsvehikels, welches
15 eine DNA-Sequenz enthält, die für einen Vorläufer des Insulinanalogons mit der
allgemeinen Aminosäuresequenz II kodiert

Met-X²_m-(Arg)_p-Z-R1-R2-R3-R4-His-Leu-Cys-(B8-B18)-Cys-(B20-B29)-R30-X¹_n-Arg-
(A1-A5)-Cys-Cys-R8-Ser-R10-Cys-Ser-Leu-R14-(A15-A19)-Cys-R21

- 20 II,
worin
- X¹_n eine Peptidkette mit n Aminosäureresten ist, wobei n eine ganze
Zahl von 0 bis 34 bedeutet,
- X²_m eine Peptidkette mit m Aminosäureresten ist, wobei m eine ganze
Zahl von 0 bis 20 bedeutet,
- 25 p 0, 1 oder 2,
- R30 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest bedeutet
oder abwesend ist und
- Z abwesend ist oder ein Peptidrest mit 1 bis 4 genetisch
30 kodierbaren Aminosäureresten, enthaltend 1 bis 4 Histidinreste
(His) bedeutet

und die übrigen Variablen die in Anspruch 1 genannten Bedeutungen haben, wobei
auch die in Anspruch 1 genannten Maßgaben gelten, Expression in einer Wirtszelle

und Freisetzung des Insulinanalogs aus dessen Vorläufer mit chemischen und/oder enzymatischen Methoden.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle ein
5 Bakterium ist.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Bakterium *E. coli* ist.

10 25. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle eine Hefe ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist.

15 27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26 zur Herstellung eines Insulinanalogs gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Vorläufer des Insulinanalogs die Sequenz

20 Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala
Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
25 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
Asn

aufweist (SEQ ID NO: 7).

30 28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26 zur Herstellung eines Insulinanalogs gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Vorläufer des Insulinanalogs die Sequenz

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

- 5 Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala
Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
Asn

- 10 aufweist (SEQ ID NO: 8).

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26 zur Herstellung eines
Insulinanalogs gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Vorläufer
des Insulinanalogs die Sequenz

- 15 Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg
His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu
Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala
20 Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys
Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

aufweist (SEQ ID NO: 9).

- 25 30. Vorläufer des Insulinanalogs gemäß Anspruch 22.

31. Vorläufer des Insulinanalogs gemäß Anspruch 27.

- 30 32. Vorläufer des Insulinanalogs gemäß Anspruch 28.

33. Vorläufer des Insulinanalogs gemäß Anspruch 29.

34. DNA-Sequenz, welche für einen Vorläufer des Insulinanalogons gemäß Anspruch 30 kodiert.
35. DNA-Sequenz, welche für einen Vorläufer des Insulinanalogons gemäß 5 Anspruch 31 kodiert.
36. DNA-Sequenz, welche für einen Vorläufer des Insulinanalogons gemäß Anspruch 32 kodiert.
- 10 37. DNA-Sequenz, welche für einen Vorläufer des Insulinanalogons gemäß Anspruch 33 kodiert.
38. Expressionsvehikel, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 34.
- 15 39. Expressionsvehikel, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 35.
40. Expressionsvehikel, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 36.
41. Expressionsvehikel, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 37.
- 20 42. Wirtszelle, die mit einem Expressionsvehikel gemäß einem der Ansprüche 38 bis 41 transformiert ist.
43. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein Insulinanalogon 25 und/oder mindestens ein physiologisch verträgliches Salz desselben gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 21.
44. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß sie das Insulinanalogon und/oder das physiologisch verträgliche Salz desselben 30 in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form enthält.
45. Pharmazeutische Zubereitung nach Ansprüche 43 oder 44, dadurch gekennzeichnet, daß sie ferner einen Depothilfsstoff enthält.

46. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, daß der Depothilfsstoff Prctaminsulfat ist, wobei das Insulinanalogon und/oder das physiologisch verträgliche Salz desselben mit dem Protaminsulfat in einem

5 Cokristallisat vorliegt.

47. Pharmazeutische Zubereitung nach einem oder mehreren der Ansprüche 43 bis 46, gekennzeichnet durch einen zusätzlichen Gehalt an unmodifiziertem Humaninsulin.

10

48. Pharmazeutische Zubereitung nach einem oder mehreren der Ansprüche 43 bis 47, gekennzeichnet durch einen zusätzlichen Gehalt an einem Insulinanalogon.

15

49. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulinanalogon Gly(A21)-Arg(B31)-Arg(B32)-Humaninsulin ist.

50. Injizierbare Lösung mit Insulinaktivität, enthaltend die pharmazeutische Zubereitung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 43 bis 49 in gelöster Form.

20

51. Injizierbare Lösung nach Anspruch 50, gekennzeichnet durch einen Gehalt von 1 µg bis 2 mg Zink pro ml.

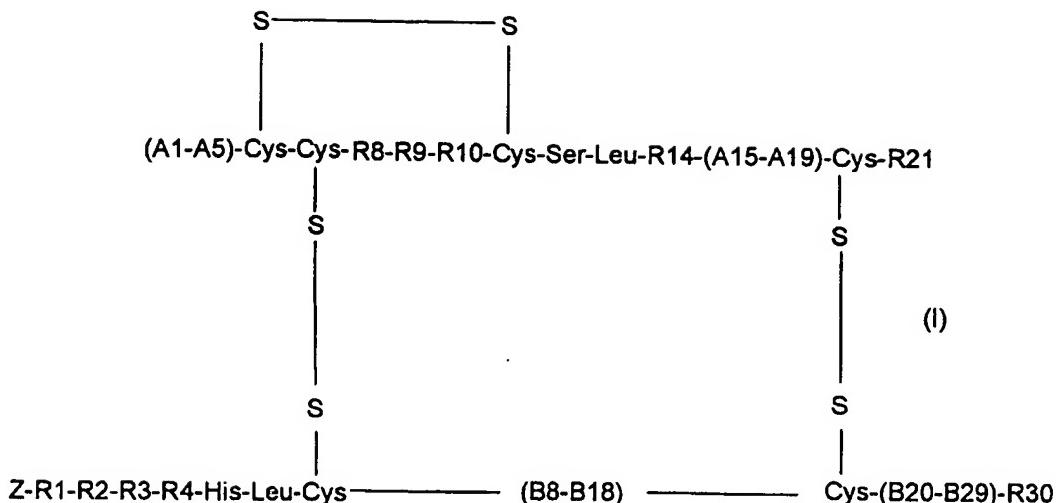
52. Injizierbare Lösung nach Anspruch 51, gekennzeichnet durch einen Gehalt von 5 µg bis 200 µg Zink pro ml.

25

53. Verwendung des Insulinanalogons und/oder dessen physiologisch verträglichen Salzes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 21 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welche eine Insulinaktivität mit verzögertem Wirkungseintritt aufweist.

30

54. Insulin-Zink-Komplex, enthaltend ein Insulinhexamer und 4 bis 10 Zinkionen pro Insulinhexamer, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulinhexamer aus sechs Molekülen eines Insulinanalogons der Formel I besteht,



worin bedeuten

- 5 (A1-A5) die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- (A15-A19) die Aminosäurereste in den Positionen A15 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- (B8-B18) die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- 10 (B20-B29) die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B29 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- R8 Thr oder Ala,
- R9 Ser oder Gly,
- 15 R10 Ile oder Val,
- R14 Tyr, His, Asp oder Glu,
- R21 Asn, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala, Glu oder Gln,
- R1 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest, abwesend oder ein Wasserstoffatom,
- 20 R2 Val, Ala oder Gly,
- R3 Asn, His, Glu oder Asp,
- R4 Ala, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Gly oder Glu,
- R30 ein beliebiger genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder -OH,

Z in Wasserstoffatom oder ein Peptidrest mit 1 bis 4 genetisch kodierbaren Aminosäureresten, enthaltend 1 bis 4 Histidinreste (His).

55. Insulin-Zink-Komplex nach Anspruch 54, enthaltend 5 bis 8 Zinkionen pro Insulinhexamer.

5

56. Insulin-Zink-Komplex nach Anspruch 54 oder 55, dadurch gekennzeichnet, daß das Insulinhexamer aus sechs Molekülen des Insulinanalogons der Formel I gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 21 besteht.

10 57. Insulin-Zink-Komplex nach Anspruch 54 oder 55, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette des Insulinanalogons der Formel I die Sequenz

Phe Val His Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

15

(SEQ ID NO: 10) aufweist.

58. Insulin-Zink-Komplex nach Anspruch 54 oder 55, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette des Insulinanalogons der Formel I die Sequenz

20

Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

(SEQ ID NO: 11) aufweist.

25

59. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens einen Insulin-Zink-Komplex gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 54 bis 58.

30

60. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine saure Lösung mindestens eines Insulinanalogons gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 54 bis 58 und/oder eines physiologisch verträglichen Salzes desselben mit einer entsprechenden Menge an Zinkionen, welche die Ausbildung eines Insulin-Zink-Komplexes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 54 bis 58 ermöglicht.

61. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 60, enthaltend eine saure Lösung des Insulinanalogs und/oder des physiologisch verträglichen Salzes desselben gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 21 mit einer 5 entsprechende Menge an Zinkionen, welche die Ausbildung eines Insulin-Zink-Komplexes gemäß Anspruch 56 ermöglicht.
62. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 60, enthaltend eine saure Lösung mindestens eines Insulinanalogs gemäß einem der Ansprüche 57 oder 58 10 und/oder eines physiologisch verträglichen Salzes desselben mit einer entsprechenden Menge an Zinkionen, welche die Ausbildung eines Insulin-Zink-Komplexes gemäß einem der Ansprüche 57 oder 58 ermöglicht.
63. Pharmazeutische Zubereitung nach einem oder mehreren der Ansprüche 59 15 bis 62, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Insulin-Zink-Komplex in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form enthält.
64. Injizierbare Lösung mit Insulinaktivität, enthaltend die pharmazeutische Zubereitung gemäß Anspruch 63 in gelöster Form. 20
65. Injizierbare Lösung nach Anspruch 64, gekennzeichnet durch einen Gehalt von 1 µg bis 2 mg Zink pro ml.
66. Injizierbare Lösung nach Anspruch 65, gekennzeichnet durch einen Gehalt 25 von 5 µg bis 200 µg Zink pro ml.
67. Verwendung des Insulin-Zink-Komplex gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 54 bis 58 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welche eine Insulinaktivität mit verzögertem Wirkungseintritt aufweist. 30

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

5

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH
- (B) STRASSE: -
- (C) ORT: Frankfurt
- (D) BUNDESLAND: -
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 65926
- (G) TELEPHON: 069-305-5307
- (H) TELEFAX: 069-357175
- (I) TELEX: -

10

(ii) ANMELDETITEL: Neue Insulinderivate zur Behandlung von
Diabetes mellitus

15

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11

20

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

30

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

40

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LAGE: 1..21

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

50

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

- 5 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

15 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
(B) LAGE: 1..30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

20 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

- 30 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

40 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
(B) LAGE: 1..30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

45 His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
1 5 10 15

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25 30

50

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

- 55 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 31 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

5 (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LAGE: 1..31

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

His Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
1 5 10 15

15 Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

20 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 32 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

30 (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LAGE: 1..32

35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

His Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala
1 5 10 15

40 Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

45 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LAGE: 1..33

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

His Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu
1 5 10 15

10

Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25 30

Thr

15

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 98 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LAGE: 1..98

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

35

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg His Phe Val Asn Gln
1 5 10 15

40

His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
20 25 30

Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp
35 40 45

45

Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Prò Gly Ala Gly Ser
50 55 60

Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val
65 70 75 80

50

Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr
85 90 95

Cys Asn

55

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 99 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

10

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
(B) LAGE: 1..99

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg His Ala Phe Val Asn
1 5 10 15
Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
20 25 30

Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu
35 40 45

Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly
50 55 60

Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile
65 70 75 80

Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn
85 90 95

Tyr Cys Asn

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

40

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 100 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

50

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
(B) LAGE: 1..100

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg His Ala Ala Phe Val
 1 5 10 15

5 Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
 20 25 30

10 Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala
 35 40 45

15 Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala
 50 55 60

20 Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly
 65 70 75 80

Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu
 25 85 90 95

20 Asn Tyr Cys Asn
 100

25 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 30 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

35

- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
 (B) LAGE: 1..30

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Phe Val His Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

45 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30

50 (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 55 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

- 5 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
(B) LAGE: 1..30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11

10 Phe Val Asp Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

15